

氏 名	藤 井 英 樹		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	第 4477 号		
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者		
学 位 論 文 名	Localization of Lymphocyte Apoptosis in the Murine Lymphoid Tissues after Stimulation of Natural Killer T cells with Alpha-Galactosylceramide (ガラクトシルセラミドによるNKT細胞の活性化に伴いマウスリンパ組織に 誘導されるリンパ球のアポトーシスの局在)		
論文審査委員	主 査 教 授 荒 川 哲 男	副主査 教 授 木 山 博 資	
	副主査 教 授 中 島 裕 司		

論 文 内 容 の 要 旨

【背景】抗原刺激によって活性化・増殖した T 細胞は組織内に浸潤して、炎症性サイトカインを分泌し、微生物や腫瘍細胞などに対する生体防御にはたらく。これら T 細胞は、その役割を果たし終えたあとは、組織にとって必ずしも有益でない炎症反応を速やかに終了させるために、apoptosis を起こして取り除かれる (= activation - induced cell death ; AICD)。最近、T 細胞同様に、第 4 のリンパ球サブセットである NKT 細胞も AICD を起こすことが in vitro の実験で示されている。しかし、NKT 細胞の AICD を in vivo で組織内での局在を示した研究はこれまでになかった。そこで、われわれは NKT 細胞を特異的に活性化することが知られている ガラクトシルセラミドを投与したマウスを用いて組織学的検索を行った。

【目的】NKT 細胞を特異的に活性化し、マウスリンパ組織に生じる AICD の局在ならびにメカニズムを調べた。

【方法】C57BL/6 系統の wild type, lpr / lpr (Fas 欠損) gld / gld (FasL 欠損) および TNF 欠損マウスにガラクトシルセラミドを 2 µg 腹腔内投与した。12 - 72 時間後に脾臓、腸間膜リンパ節および胸腺を採取し、ヘマトキシリン-エオジン染色、CD4 と TUNEL 法の二重染色、TUNEL 染色法および電子顕微鏡で観察した。

【結果】wild type マウスでは、脾臓およびリンパ節の T 細胞領域にリンパ球のアポトーシスを多数認めた。アポトーシスを起こした細胞数は投与 12 時間から増加し、24 時間でピークに達し、72 時間で正常値に戻った。二重染色では T 細胞領域に CD4 と TUNEL の double positive 細胞が、電顕ではリンパ球の核の濃縮像が認められた。

ガラクトシルセラミドが特異的に NKT 細胞を活性化することから、本実験でアポトーシス像を示した細胞は NKT 細胞であると考えられた。一方、lpr / lpr マウスおよび gld / gld マウスではリンパ球アポトーシスはほとんど起こらず、TNF 欠損マウスでは wild type マウスと同様のアポトーシスが生じた。また、wild type マウスの胸腺ではリンパ球のアポトーシスの増加はみられなかった。

【結論】NKT 細胞活性化に伴う AICD は、末梢性リンパ臓器である脾臓やリンパ節の T 細胞領域に起こり、中枢性リンパ臓器である胸腺では起こらなかった。また、このアポトーシスは、TNF ではなく Fas に依存性であると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

NKT 細胞は、第四のリンパ球サブセットとして、抗腫瘍効果を中心とした免疫担当細胞として、最近注目されてきた。しかし、その局在に関しては不明である。本研究は、NKT 細胞の生理活性のひとつである、リンパ球に対するアポトーシス誘導を指標に、NKT 細胞の局在を検討するとともに、そのアポトーシス誘導のメカニズムに

についても検討したものである。

方法として、C57BL/6 系統の wild type, 1pr/1pr (Fas 欠損), gld/gld (FasL 欠損) および tumor necrosis factor (TNF -) 欠損マウスを用い、NKT 細胞の特異的刺激薬である ガラクトシルセラミド 2 µg を腹腔内投与した。12 - 72 時間後に脾臓、腹腔内リンパ節、及び胸腺を採取した。アポトーシスは Hematoxylin-eosin 染色、TUNEL 法および電子顕微鏡を用いて確認した。また、アポトーシスに陥った細胞を明らかにするため、CD4 と TUNEL 法の二重染色を行った。

その結果、wild type マウスでは、アポトーシスをきたした細胞数の増加を、主に脾臓およびリンパ節の T 細胞領域に認めた。アポトーシスをきたした細胞数は 12 時間後に明らかになり、24 時間でピークに達し、72 時間後には正常時の値に戻った。二重染色では、T 細胞領域に CD4 および TUNEL がいずれも陽性の細胞が認められた。以上のことから、アポトーシスをきたした細胞はリンパ球のサブセットであると考えられた。一方、アポトーシスをきたした細胞数は、1pr/1pr 及び gld/gld マウスでは減少が見られたが、TNF- 欠損マウスでは明らかな減少は見られなかった。胸腺ではアポトーシスをきたした細胞数の増加はみられなかった。

以上より、NKT 細胞の活性化に伴うリンパ球のアポトーシスは脾臓、リンパ節の T 細胞領域に見られた。また、アポトーシスの機序は TNF 依存性ではなく Fas 依存性であると考えられた。

この成績は、NKT 細胞の局在およびアポトーシス誘導の経路を初めて明らかにしたものであり、NKT 細胞の病態生理的意義の解明に重要な手がかりとなりうることから、著者は博士 (医学) の称号を授与されるに値するものと判定した。